CdCl₂ によるラット精巣炎症に対するベラパミール (Verapamil) の影響

佐二木順子・福島悦子*, 平井愛山・田村 泰・吉田 尚**

Effects of Verapamil on the inflammation induced by CdCl₂ in the testis of rats The effect of a Ca²⁺-antagonist (Verapamil) on inflammation caused with CdCl₂ (5.0mg/kg) was determined in rat's testis. ① Concomitant administration of CdCl₂ and Verapamil inhibited testicular hemorrhage and an elevation in tissue level of lipid peroxide in the testis. ② When rats were administered with CdCl₂ alone, the content of phospholipids in the testis was decreased, while the content of free fatty acids in the testis was increased, whereas these changes were restored to normal after concomitant administration of Verapamil. ③ When rats were administered with CdCl₂ alone, the content of Ca in the testis was significantly increased, while the levels of Mg and K were decreased. These changes were also restored toward normal after concomitant administration of Verapamil. These results suggest that calcium plays an important role in the development of inflammation in the rat testis following the administration of CdCl₂.

Junko Sajiki・Etsuko Fukushima*, Aizan Hirai・Yasushi Tamura・Shō Yoshida**

* Chiba Prefectural Institute of Public Health

* The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University

key words: CdCl₂ inflammation, rat testis, Verapamil, phospholipids, free fatty acids, lipid peroxide, Ca, Mg, K

ベラパミールに Ca-antagonist 作用があることが証明されて¹⁾以来、本剤の薬理作用について多方面から検討がなされている。特に降圧作用、抗不整脈作用、狭心症ならびに虚血性心疾患に対する効果などについては多くの報告がある²⁻⁴⁾。しかしながら、他の組織で生ずる炎症性疾患に対する本剤の効果を検討した報告はほとんどない。

ところで、ラットに CdCl₂ を投与すると精巣に出血性の炎症が引き起こされ、その発症に脂質の代謝異常が深く関与していることはすでに明らかである。すなわち、炎症部位ではリン脂質からの不飽和脂肪酸の分解が亢進⁵⁾、その結果、脂質の過酸化がいちじるしく高まっている⁶⁾。さらにこの精巣の炎症には Ca の関与が大きく、脂質代謝に異常が生じている時期の精巣中 Ca 含量は高いことが明らかになっている⁷⁾。

今回は、このような末端組織での Ca との関連が深いと考えられる炎症変化に対するベラパミールの効果を調べた。

材料と方法

動物は 200 g 前後のウィスター系雄ラットを用いた。ベラパミール（エーザイ(株)より供与）ならびにカドミウム（CdCl₂、市販特級）は蒸留水に溶解して用いた。

CdCl₂ は皮下注射、ベラパミールは腹腔内注射により与えた。

ラットはおのおの 6 匹ずつ以下の 5 群に分けた。

A 群：対照群

B 群：ベラパミール (100mg/kg) 単独投与群

C 群：カドミウム (5.0mg/kg) 単独投与群

D 群：カドミウム (5.0mg/kg) とベラパミール (50 mg/kg) 併用群

E 群：カドミウム (5.0mg/kg) とベラパミール (100 mg/kg) 併用群

なお、投与方法については図 1 に示した。

各処置終了後、直ちに精巣を取り出し、ヘモグロビン、過酸化脂質含量を測定した。精巣の残りは脂質分画、元素分析を行うため、使用時まで -80°C にて保存した。

ヘモグロビン含量は二波長分光光度法⁸⁾、過酸化脂質は TBA 法⁹⁾にて測定した。脂質の分画は、精巣にクロロホルム・メタノール (2:1, v/v) を加え総脂質を抽

* 千葉県衛生研究所

** 千葉大学医学部第二内科学教室

図1 design of the experiment

出し、薄層クロマトグラフィー¹⁰⁾ (シリカゲルプレート 60F₂₅₄, メルク) により行った。単純脂質の分画には、石油エーテル・エチルエーテル・酢酸 (60:40:1, v/v/v), リン脂質の分画には、クロロホルム・メタノール・ギ酸・酢酸 (50:60:5.5:4.5, v/v/v/v) を溶媒として用いた。展開後、ヨウ素蒸気にてスポットを確認した後、リン脂質ならびに遊離脂肪酸の部分をかき取り定量を行った。リン脂質はかき取ったゲルに 70% PCA (perchloric acid) を加え、dry block (160°C) にて分解した後、モリブデン酸アンモニウムと反応させ比色定量した¹¹⁾。遊離脂肪酸は、脂肪酸の銅塩をクロロホルムで選択的に抽出し、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムを加え呈色させる方法¹²⁾を用いた。

元素分析については、精巣を濃硝酸にて湿式分解した後、0.1N 硝酸にて適宜希釈したものを原子吸光法 (PERKIN-ELMER 305) にて定量した。

データについては、誤差分散が平均値に比例していたので、ヘモグロビン、PE (ホスファチジルエタノールアミン)、遊離脂肪酸については $(\log(x+1))^{1/4}$, PL (総リン脂質)、PC (ホスファチジルコリン) については $(\log x)^{1/4}$, 過酸化脂質については対数にそれぞれ変換した後、分散分析を行い差が認められたものについて多重検定 (Turkey 法) を行った。

図2 hemoglobin concentrations in rats testis of 5 groups

- Each value represents the mean $\pm$ SD.
- Unit is described in "Methods" in detail
- Significant differences exist between different letters.

図3 lipoperoxide concentrations in rats testis of 5 groups

- Each value represents the mean $\pm$ SD.
- Unit is described in "Methods" in detail.
- Significant differences exist between different letters.

結果

体重ならびに精巣重量については、群間に有意差は認められなかった。

精巣内出血の程度を示すヘモグロビン含量について、ベラパミール併用群 (D, E 群) の値は Cd 単独投与群に比べ有意に低かったが、対照群 (A, B 群) の値より高かった (図2)。Cd 単独投与群で有意に増加する過酸化脂質値について、ベラパミール併用群の値は対照群 (A, B 群) のレベルまで抑制された (図3)。

図4には各群の精巣中リン脂質ならびに遊離脂肪酸の含量を示した。総リン脂質, PC, ならびに PE につい

図4 concentrations of phospholipids and free fatty acids in rats testis of 5 groups

- Each value represents the mean $\pm$ SD.
- Unit is described in "Method" in detail.
- Significant differences exist between different letters in each parameter (PL, PC, PE and FFA).

表1 concentrations of mineral in rat testis

group	Ca ($\mu\text{g/g}$)	Mg ($\mu\text{g/g}$)	K (g/g)	Zn ($\mu\text{g/g}$)
A cont.	25.7 $\pm$ 7.6 ^b	152.8 $\pm$ 9.4 ^{ab}	4.1 $\pm$ 0.6 ^a	24.8 $\pm$ 1.5 ^{ab}
B (Ver)	28.2 $\pm$ 0.3 ^b	163.7 $\pm$ 8.5 ^a	4.9 $\pm$ 0.2 ^a	29.0 $\pm$ 2.2 ^b
C (Cd)	124.4 $\pm$ 65.8 ^a	88.2 $\pm$ 18.7 ^c	1.5 $\pm$ 0.9 ^b	22.5 $\pm$ 2.9 ^a
D (Ver ₅₀ + Cd)	52.2 $\pm$ 5.5 ^{ab}	124.7 $\pm$ 27.1 ^b	2.5 $\pm$ 0.8 ^b	24.6 $\pm$ 2.8 ^{ab}
E (Ver ₁₀₀ + Cd)	60.3 $\pm$ 13.2 ^{ab}	138.7 $\pm$ 12.3 ^{ab}	2.1 $\pm$ 0.8 ^b	25.1 $\pm$ 1.8 ^{ab}

Significant differences exist between different letters.

ては、 CdCl_2 単独投与群において値は有意に低下するが、ベラパミールの併用により改善され、対照群 (A, B 群) とに差は認められなかった。一方、遊離脂肪酸の含量については、 CdCl_2 単独投与群で有意な増加が認められるが、ベラパミールの併用で値は対照群の示す値まで抑制された。

表1には、精巣内の各元素 (Ca, Mg, Zn, K) 含量を示した。Ca について、Cd 単独投与群は対照群 (A, B 群) に比べ有意に高い値を示したが、ベラパミールの併用により値は低下した。しかしベラパミール併用群 (D, E 群) の示した値は対照群 (A, B 群) より高かった。Mg については、 CdCl_2 単独投与群の値が対照群 (A, B 群) より有意に低かったが、ベラパミール併用により改善された。K については、 CdCl_2 投与群でいちじるしい値の減少が認められた。この減少はベラパミール併用でかなり抑えられたが、完全ではなかった。Zn については、ベラパミール単独投与群と CdCl_2 単独投与群との間に 1% 水準で有意差が認められたが、その他の群間には有意差が認められなかった。

考 察

CdCl_2 投与により引き起こされる精巣の炎症発症過程において、Ca の関与が大きいことはすでに報告したり。しかしながら、Ca がこの炎症発症のうえでいかなる役割を果たしているかについては、まったく不明である。

本実験においては、ベラパミールを CdCl_2 と併用すると、 CdCl_2 単独投与後初期に観察される過酸化脂質の増加がいちじるしく抑えられ、対照群とに値の差が認められなかった。また肉眼的にも CdCl_2 単独投与群に特有の暗赤色変化が認められず、出血度合を示す精巣中ヘモグロビン値も低下しており、炎症が軽減されたことは明らかであった。

ところで、 CdCl_2 中毒ラットの精巣における過酸化脂質の増加は、リン脂質から不飽和脂肪酸の遊離の亢進により助長されるものと考えられている¹³⁾。今回、ベラパミールの併用でリン脂質から脂肪酸の遊離はいちじるしく抑制され、リン脂質含量、遊離脂肪酸含量ともに対照群とに差が認められなかった。すでに細胞レベルでは Ca イオンはリン脂質の分解を促進する重要な因子であることが明らかである¹⁴⁾。おそらく今回のベラパミール

による過酸化脂質値の増加抑制の原因としては、ベラパミールにより精巣内細胞の Ca イオン流が阻害され、その結果、リン脂質の分解が抑制されたことが考えられる。

精巣内細胞レベルでの Ca イオンの変動については検討していないが、精巣内 Ca の含量は表 1 に示したとおり、CdCl₂ 単独投与群に比べるとベラパミール併用群は有意に低い値を示した。しかし、その値は、対照群よりは明らかに高かった。また、Ca 含量のベラパミールによる抑制率は、ベラパミールの投与量に依存していなかった。このことは、ベラパミールにより抑制されえない Ca の精巣への流入の可能性を示している。このような Ca が精巣内でどのような存在形態をとっているか不明であるが、CdCl₂ 単独投与ラットを放置しておく、約 1 年後には精細管が Ca と P を主成分とする物質で埋められる（器質化）ことが明らかである¹⁵⁾。今後、CdCl₂ 中毒ラット体内の Ca 動態については、Cd 代謝との関連を考慮に入れたうえでの検討が必要と考えられる。

K, Mg の精巣内における動態は、Ca のそれと逆相関を示していた。Nicholson ら¹⁶⁾は、CdCl₂ 投与マウスの腎尿細管のミトコンドリア中で K, Mg が有意に低下していることを X 線分析により確認している。なお、阿部ら¹⁷⁾は、CdCl₂ 投与ラットの肝臓、腎臓中で Na⁺-K⁺-Mg²⁺-ATPase 活性値が低下していることを認め、その理由として、Cd 投与により生体内ミネラルのバランスが崩れたことをあげている。

このように、CdCl₂ 投与により生体内諸元素組成に乱れが生ずることは明らかであるが、これら元素組成の乱れが精巣炎症の直接の原因になっているかについては、さらに検討する必要がある。少なくともベラパミール投与により K, Mg の変動が正常化される傾向にあった事実は、精巣内 Ca の動きが他の元素のバランスに大きく影響していることを示しているものと考えられる。

文 献

- 1) Fleckenstein, A: Specific inhibitors and promoters of calcium action in the excitation-contraction coupling of heart muscle and their role in the prevention of production of myocardial lesion. In Calcium and the Heart. ed. by Harris, P., Opie, L., New York, Academic Press, 1971, p. 135-188.
- 2) 谷村英彦・他：高血圧症に対する Verapamil の降圧効果。臨床と研究 54: 229-234, 1977.
- 3) 安井昭二・他：不整脈に対する Verapamil の臨床的検討。臨床と研究 55: 323-328, 1978.
- 4) Reimer, K.A., Lowe, J.E., Jennings, R.B.: Effect of the calcium antagonist Verapamil on necrosis following temporary coronary artery occlusion in dogs. Circulation 55: 581-587, 1977.
- 5) Shibata, T., Yoshida, Y., Waku, K: Effect of cadmium exposure on the lipid composition of rat testis *in vivo*. Eisei Kagaku 29: 46, 1983.
- 6) Sajiki, J., Fukuda, Y., Fukushima, E.: On the lipoperoxide concentrations in the viscera of rats intoxicated by cadmium chloride. J. Appl. Biochem. 3: 467-471, 1981.
- 7) 佐二木順子, 福島悦子, 福田芳生, 平井愛山, 田村 泰, 吉田 尚: CdCl₂ によるラット精巣炎症に対するメチル B₁₂ の効果について。炎症 5: 45-50, 1985.
- 8) 佐二木順子: 二波長分光光度計による臓器中ヘム蛋白測定法の検討とその意義。SI News (The Hitachi) 25: 2101-2106, 1982.
- 9) Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95: 351-358, 1979.
- 10) 小沢昭夫・他：薄層クロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィーを用いたヒト血しょう、血小板、赤血球膜の脂質分画の高級脂肪酸の定量法。分析化学 32: 174-178, 1983.
- 11) Bartlett, G.R.: Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem. 234: 466-468, 1959.
- 12) Itaya, K., Ui, M.: Colorimetric determination of free fatty acids in biological fluids. J. Lipid Research 6: 16-20, 1965.
- 13) 佐二木順子, 福島悦子, 藤代良彦: カドミウムによる精巣障害の発症過程における脂質過酸化の関与について。衛生化学 29: 389-393, 1983.
- 14) Van den Bosch, H.: Intracellular phospholipase A. Biochim. Biophys. Acta 604: 191-246, 1980.
- 15) 佐二木順子, 福田芳生: カドミウムによる精巣障害関連因子の経時変化について。衛生化学 30: 177-182, 1984.
- 16) Nicholson, J.K., Kendal, M.D., Osborn, D.: Cadmium and mercury nephrotoxicity. Nature 304: 633-635, 1983.
- 17) 阿部登茂子, 糸川嘉則: 実験的カドミウム中毒に関する研究(3). *In vivo*, *In vitro* においてカドミウムがラットの Na-K-Mg-dependent ATPase, Mg-dependent ATPase および Transketolase におよぼす影響。日本衛生学雑誌 28: 243-247, 1973.